

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の牛伝染性鼻気管炎生ワクチンの項を次のように改める。

牛伝染性鼻気管炎生ワクチン

1 定義

弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス No.758-43 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

牛の皮下、筋肉及び鼻腔内に接種しても病原性を示さず、妊娠牛に接種しても異常産を起こさない。

2.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.6.2 の豚精巢初代若しくは継代細胞又は牛腎継代細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は3代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.6.2 の豚精巢初代細胞若しくは継代細胞又は牛腎継代細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 細胞の培養

1回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について、3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた安定剤を加えて混合し、最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.3の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞の1%以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養する。対照培養細胞をプールし、4本以上の培養びん及びカバーグラスを入れた4枚以上のシャーレに継代し、7日間培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄後、2群に分け、生理食塩液で調整した0.1vol%のモルモット及びがちょうの赤血球浮遊液を重層し、60分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1の試験最終日に培養カバーグラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.1.4 迷入ウイルス否定試験

3.1.1の試験最終日に採取した培養液の2 mLについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 2.3.1.3を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 原液の試験

3.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.3.1、2.4.1、2.4.2 及び 2.7.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

牛白血病ウイルスについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 2.8.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その方法とする。

ただし、中和用血清は、抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清（付記1）を非働化したものを用いる。

3.2.3 ウイルス含有量試験

3.2.3.1 試験材料

3.2.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記2）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.2.3.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で7日間培養し、観察する。

3.2.3.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{6.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する液体でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.3.2 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.5 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

ただし、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

3.3.6 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.4.1 及び 2.4.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

ただし、中和用血清は、抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清を非働化したものを用いる。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.2.3 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり $10^{4.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.8 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.9 安全試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.1.2 試験動物

体重 100 ～ 200kg の牛を用いる。

3.3.9.2 試験方法

注射材料 1 頭分を 1 頭の試験動物の筋肉内に注射し、14 日間観察する。

3.3.9.3 判定

観察期間中、軽い発熱（40.5℃以下）を認めても 3 日間以上継続せず、その他の異常を認めてはならない。

3.3.10 力価試験

3.3.10.1 試験材料

3.3.10.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.1.2 中和試験用ウイルス

牛腎又は牛精巢継代細胞で増殖させた強毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス No.758 株を用いる。

3.3.10.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.3.10.2 試験方法

3.3.9 の試験終了後、14 日目に得られた血清について中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.2mL 中約 100PFU の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で 60 分間処理する。この混合液 0.2mL ずつをそれぞれ 2 枚（穴）の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、混合液を除き、第 1 次重層寒天培地（付記 3）5 mL を加え、37℃ 5 vol % 炭酸ガス下で 3 ～ 5 日間培養した後、第 2 次重層寒天培地（付記 4）3 mL を加え、更に 24 時間培養後、ブラック数を算定する。

3.3.10.3 判定

ブラック数がウイルス対照の 50 % 以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。
試験動物の中和抗体価は、2 倍以上でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

付記1 抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清

牛伝染性鼻気管炎ウイルスで免疫した兎の血清で、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記2 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

ラクトアルブミン水解物

5 g

酵母エキス

1 g

アール液又はハンクス液

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ～ 7.4 に調整する。

牛伝染性鼻気管炎ウイルスに対する中和抗体陰性の牛又はやぎ血清を 2 ～ 5 vol% となるように加えてもよい。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記3 第1次重層寒天培地

1,000mL 中

イーグル MEM

880 mL

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95g

寒天

8 g

牛又はやぎ血清

5 ～ 20 mL

水

残 量

牛又はやぎ血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

付記4 第2次重層寒天培地

1,000mL 中

イーグル MEM

900 mL

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95g

寒天

8 g

ニュートラルレッド

0.05g

水

残 量